บทความวิจัย

การคัดเลือกยีสต์ที่มีความทนต่อแรงกดดันและการแปรผันอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน

กุสุมาวดี ฐานเจริญ*, จิรานันท์ สำโรงพล, พรสุดา แก่นนาคำ และพัชรีพร บุญลิตร

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏมหาสารคาม ถ. นครสวรรค์ ต. ตลาด อ. เมือง จ. มหาสารคาม 44000

บทคัดย่อ

การคัดแยกยีสต์ทนร้อนจากตัวอย่างชานอ้อยของโรงงานน้ำตาลด้วยอาหาร Yeast extract-Peptone-Dextrose (YPD) medium ที่เติมเอทานอลร้อยละ 4 (v/v) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สามารถคัดแยกยีสต์ได้ทั้งหมด 98 ไอโซเลต คัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถผลิตเอทานอลจากการสร้างแก๊สในอาหารเหลว พบว่า มียีสต์จำนวน 23 ไอโซเลตที่สร้างแก๊สตั้งแต่ 4.0-5.0 เซนติเมตรในหลอดดักแก๊ส การทดสอบความทนต่ออุณหภูมิ และความทนต่อน้ำตาล พบว่า ยีสต์ที่คัดเลือกได้ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส มีบางไอโซเลตที่สามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส ได้แก่ รหัส BRMU02, BRMU03, BRMU04, BRMU06, BRMU08, BRMU12, BRMU17, BRMU19, BRMU29 และ BRMU30 อย่างไรก็ตามยีสต์ที่คัดเลือกทุกไอโซเลตไม่สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ผลการทดสอบความทนต่อน้ำตาลพบว่า ยีสต์ที่คัดเลือกได้ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีที่ความเข้มข้นกลูโคสสูงสุด ร้อยละ 30 (w/v) และมียีสต์ 9 ไอโซเลตที่เจริญได้ดีที่ความเข้มข้นไซโลสสูงสุดร้อยละ 20 (w/v) การผลิตเอทานอลในอาหารสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส พบว่า ยีสต์รหัส BRMU29, BRMU19 และ BRMU08 ให้ผลได้เอทานอลสูงสุดเป็นร้อยละ 7.28, 7.05 และ 6.89 (%, v/v) ตามลำดับ เมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียสต่อการผลิตเอทานอล พบว่า ยีสต์รหัส BRMU29 สามารถผลิตเอทานอลได้ดีที่สุดเป็นร้อยละ 3.76, 3.64 และ 3.68 (w/v) ที่เวลา 36, 48 และ 60 ชั่วโมง ตามลำดับ จากงานวิจัยในครั้งนี้ พบว่า ยีสต์ทั้ง 3 ไอโซเลตมีความน่าสนใจในการนำไปใช้เป็นเชื้อตั้งต้นเพื่อผลิตเอทานอล เนื่องจากสามารถเจริญได้ดีและผลิตเอทานอลได้สูงที่อุณหภูมิสูง และยังมีความสามารถในการทนต่อน้ำตาลความเข้มข้นสูงซึ่งจะช่วยในการลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นในระหว่างการหมัก

คำสำคัญ : การสร้างแก๊ส, น้ำอ้อย, ยีสต์ทนร้อน, อุณหภูมิสูง, เอทานอล

* ผู้เขียนให้ติดต่อ : E-mail : Kusumawadee_yeast@hotmail.com

Screening of Stress Tolerant Yeast and Temperature Variable for Ethanol used Sugarcane Juice as a Carbon Source

Kusumawadee Thancharoen*, Jiranan Sumrongpol, Pornsuda Kannakam and Patchareeporn Boonyalit

Department of Biology, Faculty of Science and Technology, Rajabhat Mahasarakham University, Nakronsawan road, Mueng, Maha Sarakham 44000

Abstract

Isolation of thermotolerant yeast strain from sugarcane bagasses in sugar factory was carried out in Yeast extract-Peptone-Dextrose (YPD) medium with ethanol 4% (v/v) and incubation at 37 °C. Ninety-eight thermotolerant yeast isolates were screened that are able to produce ethanol from gases generated in liquid yeast indicate that 23 isolates gas generated from 4.0-5.0 cm in a Durham tube. Study of osmotolerant and thermotolerant showed that selected yeast isolates grow well at temperatures of 37-45°C, with some isolates can grow well at a temperature of 47 °C include BRMU02, BRMU03, BRMU04, BRMU06. , BRMU08, BRMU12, BRMU17, BRMU19, BRMU29 and BRMU30 but all selected yeast isolates were unable to grow at a temperature of 50 °C. Osmotolerant results exhibited all isolates can grow well at glucose concentration 30% (w/v) and nine isolates that grow well at xylose concentration 20% (w/v). Ethanol in synthesis medium at 37 °C that was produced from BRMU29, BRMU19 and BRMU08 were 7.28, 7.05 and 6.89 (%, v/v), respectively. Variable of high temperature for ethanol production in sugarcane juice fermentation medium, including 37, 40 and 45 °c showed that BRMU29 can produced the highest ethanol were 3.76, 3.64 and 3.68% (w/v) at 36, 48 and 60 hours, respectively. The research revealed that three yeast isolates are interesting in applying to a starter culture for the production of ethanol because it can grow well and produced ethanol at high temperatures. They also have the ability to tolerate high concentrations of sugar to reduced the contamination of other microbes during fermentation

Keywords: Gas production, Sugarcane juice, Thermotolerant Yeast, High temperature, Ethanol

*Corresponding author : E-mail : Kusumawadee_yeast@hotmail.com

บทนำ

ปัจจุบันหลายประเทศ เช่น ประเทศบราซิล จีน ฝรั่งเศส อังกฤษ อินเดีย และแอฟริกาใต้ มีการผลิตเอทานอลเพื่อใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิง เนื่องจากสภาวะเศรษฐกิจที่เกิดจากราคาน้ำมันดิบที่สูงขึ้น โดยกระบวนการผลิตเอทานอลนิยมใช้วิธีการหมัก พบว่า 60 เปอร์เซ็นต์ทั่วโลกมีการผลิตเอทานอลจากพืชที่มีน้ำตาล ได้แก่ กากน้ำตาล ขณะที่ประเทศแถบยุโรปใช้ผักกาดหวาน และข้าวฟ่างเป็นวัตถุดิบ ประเทศไทยก็ประสบปัญหาราคาน้ำมันจากปิโตรเลียมที่สูงขึ้นเช่นกัน เนื่องจากต้องนำเข้าน้ำมันจากต่างประเทศเกือบทั้งหมด (Pimpakan, 2012) รัฐบาลส่งเสริมการผลิตเอทานอลเพื่อเป็นเชื้อเพลิง และได้สนับสนุนให้มีการใช้เอทานอลผสมกับน้ำมันเบนซินประมาณ 10-20% เพื่อผลิตแก๊สโซฮอล์ การใช้แก๊สโซฮอล์นอกจากจะช่วยลดเงินตราที่จะใช้ซื้อน้ำมันจากต่างประเทศแล้ว ยังช่วยลดปัญหาราคาตกต่ำของผลผลิตทางการเกษตร เช่น อ้อย และ มันสำปะหลัง (Limtong *et al*., 2008) พบว่า 90% ของการผลิตเอทานอลได้มาจากกระบวนการการหมัก (Fermentation) ที่เหลือได้จากการสังเคราะห์ (Synthesis) จุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอทานอลได้มีหลายชนิด ยีสต์ถูกนำมาใช้ผลิตเอทานอลอย่างแพร่หลายเนื่องจากสามารถเจริญเติบโตได้เร็วและมีปริมาณมาก นอกจากนี้ยีสต์เป็นจุลินทรีย์ที่มีความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพมากที่สุดสำหรับการเปลี่ยนน้ำตาลเป็นเอทานอล ในสมัยดั้งเดิมได้ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการหมักกลูโคสจากผลผลิตทางการเกษตรเป็นเอทานอล (Haggran

et al., 2014). ยีสต์พบในสภาพแวดล้อมที่หลากหลาย แต่จะพบบ่อยที่สุดจากตัวอย่างที่อุดมไปด้วยน้ำตาล นอกจากนี้ยีสต์บางชนิดสามารถพบในดิน และแมลง ในการคัดเลือกยีสต์สำหรับใช้ในอุตสาหกรรมคุณสมบัติที่จำเป็นคือ ลักษณะสรีรวิทยาที่เฉพาะเจาะจง ได้แก่ ความทนต่ออุณหภูมิสูง ความทนต่อน้ำตาลกลูโคส และความทนต่อเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูง ดั้งนั้นยีสต์จึงถูกนำมาใช้ในการผลิตเชื้อเพลิงทางชีวภาพ แหล่งคาร์บอนในการผลิตพลังงานทางเลือกที่สำคัญ คือ น้ำตาล แป้งจากพืชผลทางการเกษตร และวัสดุลิกโนเซลลูโลส

ประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อน การหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการผลิตเอทานอลที่มีประสิทธิภาพ โดยอุณหภูมิเฉลี่ยต่อวันมักจะสูงตลอดทั้งปี ข้อดีของการหมักที่อุณหภูมิสูงไม่ได้มีเพียงลดความเสี่ยงของการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ แต่ยังลดค่าใช้จ่ายในการระบายความร้อน และสามารถเกิดการหมักได้รวดเร็ว ดังนั้นจึงจำเป็นต้องใช้ยีสต์สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพที่สามารถทนต่ออุณหภูมิสูง เมื่อเร็วๆ นี้นักวิจัยได้พยายามที่จะคัดแยกสายพันธุ์ของยีสต์ที่ทนอุณหภูมิสูงและมีความสามารถในการเจริญเติบโตในเอทานอลเข้มข้นสูง *Saccharomyces cerevisiae* เป็นยีสต์ที่มีความสามารถในการเปลี่ยนน้ำตาลซูโครสให้เป็นน้ำตาลกลูโคส และฟรุกโตส แต่มีข้อจำกัดในช่วงอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการผลิตเอทานอลเท่ากับ 30-35 องศาเซลเซียส ดังนั้นจึงเป็นเหตุผลให้นำไปสู่การศึกษาความสามารถของยีสต์ทนอุณหภูมิสูง โดยลักษณะที่สำคัญของยีสต์ที่ใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในโรงงานอุตสาหกรรมจำเป็นต้องมีผลผลิตเอทานอลที่สูง (>90.0% ของผลผลิตทางทฤษฎี) มีความทนทานต่อเอทานอล (>40.0 กรัม/ ลิตร) มีอัตราการผลิตเอทานอลสูง (>1.0 กรัม/ลิตร/ชั่วโมง) สามารถเจริญเติบโตในอาหารที่ง่ายและราคาไม่แพง มีความต้านทานต่อสารยับยั้ง และมีความทนต่อพีเอชที่เป็นกรดหรืออุณหภูมิที่สูงขึ้น จากรายงานพบยีสต์ทนอุณหภูมิสูงและสามารถผลิตเอทานอลได้ เช่น *S. cerevisiae* (สายพันธุ์ที่มีการปรับปรุงพันธุกรรม), *S. diastaticus*, *Kluyveromyces marxianus* และ *Pichia kudriavzevii,* (Zabed *et al*., 2014) สำหรับน้ำอ้อยยังไม่ค่อยมีผู้ใช้สำหรับการผลิตเอทานอลในประเทศไทย ซึ่งอาจจะเป็นเพราะประเทศไทยใช้น้ำอ้อยสำหรับผลิตน้ำตาลทราย โดยเป็นผู้ผลิตและส่งออกน้ำตาลทรายสำคัญของโลก สำหรับประเทศไทยมีการปลูกอ้อยในหลายพื้นที่ทั้งภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคเหนือ และภาคกลาง โดยมีรายงานการวิเคราะห์น้ำตาลที่เป็นองค์ประกอบในน้ำอ้อย ได้แก่ ซูโครส 12.75 ± 0.28, กลูโคส 1.58 ± 0.10, ฟรุกโตส 1.51 ± 0.24 และน้ำตาลทั้งหมด 15.84 ± 0.59% จึงมีความน่าสนใจในการใช้เป็นแหล่งคาร์บอนเพื่อการผลิตเอทานอล ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งเน้นในการศึกษาประสิทธิภาพของยีสต์ทนร้อนและทนต่อน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงเพื่อผลิตเอทานอลโดยใช้น้ำอ้อยที่มีอย่างแพร่หลายในท้องถิ่นเป็นแหล่งคาร์บอน

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การคัดแยกยีสต์จากชานอ้อย

คัดแยกยีสต์ทนอุณหภูมิสูงจากชานอ้อยของโรงงานน้ำตาลโดย enrichment technique ใน Yeast extract Peptone Dextrose (YPD) medium (ประกอบด้วย yeast extract 10 กรัมต่อลิตร, glucose 20 กรัมต่อลิตร, peptone 20 กรัมต่อลิตร โดยเติม absolute ethanol 4 % v/v) ชั่งชานอ้อย 10 กรัม ลงใน YPD medium ปริมาตร 100 มิลลิลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง spread plate บนอาหาร YPD agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง หลังจากนั้นแยกเป็นโคโลนีเดี่ยวในอาหารชนิดเดิม ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา แล้วจึงเก็บใน YPD agar slant ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

2. การคัดเลือกยีสต์ที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอทานอล (Brooks, 2008)

เตรียมอาหารทดสอบการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (ประกอบด้วย yeast extract 3 กรัมต่อลิตร, peptone 5 กรัมต่อลิตร, glucose 20 กรัมต่อลิตร) บรรจุหลอดดักแก๊สในหลอดทดลองที่มีอาหารปริมาตร 8 มิลลิลิตร เติมเชื้อตั้งต้น 1 ลูป บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ตรวจสอบผลการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ทุก 24 ชั่วโมง (เป็นเวลา 72 ชั่วโมง) ทำการคัดเลือกเชื้อยีสต์ทนอุณหภูมิสูงที่สร้างแก๊สในปริมาณสูงสุด

3. การทดสอบความทนต่ออุณหภูมิสูง

เพาะเชื้อยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 บนอาหาร YPD agar plate โดยแปรผันอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม ได้แก่ 37, 40, 42, 45, 47 และ 50 องศาเซลเซียส บันทึกผลการเจริญตามแนวเขี่ยเชื้อที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

4. การทดสอบความทนต่อน้ำตาล

แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและไซโลส ที่ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 % ในอาหารYPD agar plate และ yeast extract-peptone-xylose (YPX) agar plate (ประกอบด้วย yeast extract 10กรัมต่อลิตร, xylose 20 กรัมต่อลิตร, peptone 20 กรัมต่อลิตร) เขี่ยเชื้อยีสต์ลงบนอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสบันทึกผลการเจริญตามแนวเขี่ยเชื้อที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

5. การเตรียมเชื้อตั้งต้น

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ YPD medium เขี่ยเชื้อยีสต์ลงในอาหาร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส อัตราการเขย่า 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (วัดค่าการดูดกลืนแสงความยาวคลื่น 600 nm กำหนดเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ 1.0)

6. การคัดเลือกยีสต์ที่สามารถผลิตเอทานอลในอาหารสังเคราะห์

เติมเชื้อยีสต์ตั้งต้นที่เตรียมจากข้อ 5 ลงในอาหารหมัก fermentation medium (ประกอบด้วยไดแอมโมเนียมซัลเฟตร้อยละ 0.1, โปแตสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตร้อยละ 0.1, แมกนีเซียมซัลเฟตเฮปตะไฮเดรตร้อยละ 0.1 และกลูโคสร้อยละ 18) ปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 (Limtong *et al.,* 2007) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างโดยการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที วิเคราะห์ปริมาณเอทานอลด้วยเครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

7. การแปรผันอุณหภูมิต่อการผลิตเอทานอลในน้ำอ้อย

เติมเชื้อยีสต์ตั้งต้นลงในอาหารหมัก sugarcane juice fermentation medium ที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน (18 องศาบริกซ์) ปรับพีเอชเท่ากับ 5.0 (Limtong *et al.,* 2007) บ่มบนเครื่องเขย่าความเร็วรอบ 120 รอบต่อนาที เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เก็บตัวอย่างทุก 12 ชั่วโมง วัดความขุ่นของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร วิเคราะห์ปริมาณน้ำตาลและเอทานอลด้วยเครื่อง HPLC

ผลและวิจารณ์ผลการวิจัย

1. การคัดแยกยีสต์ทนร้อน

การคัดแยกยีสต์ทนร้อนจากตัวอย่างกากอ้อยที่เก็บจากโรงงานน้ำตาลมิตรภูเวียง จังหวัดขอนแก่น ทั้งหมด 15 ตัวอย่าง สามารถคัดแยกยีสต์ทนร้อนได้ทั้งหมด 98 ไอโซเลท (ไม่ได้แสดงผล) โคโลนีส่วนใหญ่มีสีครีม ผิวโคโลนีมันวาว ขอบโคโลนีเรียบ ระดับความนูนของโคโลนีมีความนูนโค้ง และรูปแบบโคโลนีกลม

2. การคัดเลือกยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการหมัก

ยีสต์จำนวนทั้งหมด 98 ไอโซเลต ทดสอบความสามารถในการสร้างแก๊สในอาหารเหลว ผลการทดลองแสดงดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณแก๊สและความสามารถในการตกตะกอนของยีสต์

รหัสยีสต์	ปริมาณแก๊ส (เซนติเมตร)	การเจริญใน อาหารเหลว	รหัสยีสต์	ปริมาณแก๊ส (เซนติเมตร)	การเจริญใน อาหาร เหลว
BRMU01	0.1	เจริญทั่วหลอด	BRMU 50	4.6	ตกตะกอน
BRMU02	4.0	ด้านบน	BRMU 51	4.5	ตกตะกอน
BRMU03	4.8	ตกตะกอน	BRMU 52	0	ตกตะกอน
BRMU04	4.5	ตกตะกอน	BRMU 53	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU05	3	เจริญทั่วหลอด	BRMU 54	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU06	4.5	ด้านบน	BRMU 55	4.8	ตกตะกอน

BRMU07	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 56	4.6	ตกตะกอน
BRMU08	4.0	ตกตะกอน	BRMU 57	4.0	เจริญทั่วหลอด
BRMU09	5	ตกตะกอน	BRMU 58	0.6	เจริญทั่วหลอด
BRMU10	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 59	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU11	3.5	ตกตะกอน	BRMU 60	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU12	5.0	ตกตะกอน	BRMU 61	4.5	ตกตะกอน
BRMU13	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 62	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU14	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 63	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU15	5	เจริญทั่วหลอด	BRMU 64	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU16	5.0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 65	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU17	4.5	ตกตะกอน	BRMU 66	0	ตกตะกอน
BRMU18	5	เจริญทั่วหลอด	BRMU 67	0	เจริญทั่วหลอด

ตารางที่ 1 ปริมาณแก๊สและความสามารถในการตกตะกอนของยีสต์ (ต่อ)

รหัสยีสต์	ปริมาณแก๊ส (เซนติเมตร)	การเจริญ ในอาหารเหลว	รหัสยีสต์	ปริมาณแก๊ส (เซนติเมตร)	การเจริญ ในอาหารเหลว
BRMU19	4.8	ด้านบน	BRMU 68	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU20	3.0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 69	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU21	4.5	เจริญทั่วหลอด	BRMU 70	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU22	0.1	เจริญทั่วหลอด	BRMU 71	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU23	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 72	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU24	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 73	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU25	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 74	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU26	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 75	0.3	เจริญทั่วหลอด
BRMU27	0.2	เจริญทั่วหลอด	BRMU 76	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU28	5	เจริญทั่วหลอด	BRMU 77	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU29	4.7	ด้านบน	BRMU 78	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU30	4.6	ตกตะกอน	BRMU 79	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU31	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 80	0	เจริญทั่วหลอด

BRMU32	4.3	เจริญทั่วหลอด	BRMU 81	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU33	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 82	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU34	4.6	ตกตะกอน	BRMU 83	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU35	4.8	ตกตะกอน	BRMU 84	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU36	4.5	ตกตะกอน	BRMU 85	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU 37	0	ตกตะกอน	BRMU 86	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU 38	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 87	0	ตกตะกอน
BRMU 39	5	เจริญทั่วหลอด	BRMU 88	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU 40	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 89	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU 41	4.2	ตกตะกอน	BRMU 90	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU 42	4.5	ตกตะกอน	BRMU 91	4.5	ด้านบน
BRMU 43	0	ตกตะกอน	BRMU 92	0	ตกตะกอน

ตารางที่ 1 ปริมาณแก๊สและความสามารถในการตกตะกอนของยีสต์ (ต่อ)

รหัสยีสต์	ปริมาณแก๊ส (เซนติเมตร)	การเจริญ ในอาหารเหลว	รหัสยีสต์	ปริมาณแก๊ส (เซนติเมตร)	การเจริญ ในอาหารเหลว
BRMU 44	3.5	ตกตะกอน	BRMU 93	0	ตกตะกอน
BRMU 45	4.7	ตกตะกอน	BRMU 94	0	เจริญทั่วหลอด
BRMU 46	0	เจริญทั่วหลอด	BRMU 95	5	เจริญทั่วหลอด
BRMU 47	0.7	ตกตะกอน	BRMU 96	5	เจริญทั่วหลอด
BRMU 48	0	ตกตะกอน	BRMU 97	0	ตกตะกอน
BRMU 49	4.8	ตกตะกอน	BRMU 98	0	เจริญทั่วหลอด

ผลการทดลองจากตารางที่ 1 พบว่า ยีสต์จำนวน 23 ไอโซเลต สร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์อยู่ในช่วง 4.0–5.0 เซนติเมตร ได้แก่ ยีสต์รหัส BRMU02, BRMU03, BRMU04, BRMU06, BRMU08, BRMU12, BRMU17, BRMU19, BRMU29, BRMU30, BRMU34, BRMU35 ,BRMU36, BRMU41, BRMU42, BRMU45, BRMU49, BRMU50, BRMU51 ,BRMU55, BRMU56, BRMU61 และ BRMU91 ยีสต์ส่วนใหญ่มีการเจริญที่ก้นหลอด ยกเว้นยีสต์รหัส BRMU15, BRMU16, BRMU18, BRMU21, BRMU28, BRMU32, BRMU39 ,BRMU57, BRMU95, BRMU96 มีการเจริญทั่วหลอด และยีสต์รหัส BRMU02, BRMU06, BRMU19, BRMU29, BRMU91 มีการเจริญด้านบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยคุณสมบัติของการตกตะกอนเป็นคุณสมบัติที่ดีของการเป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเอทานอลในระดับอุตสาหกรรม เนื่องจากทำให้ง่ายต่อการเก็บเกี่ยวและสามารถนำเซลล์ยีสต์กลับมาใช้ใหม่ได้ นอกจากนี้ในการคัดเลือกยีสต์ที่มีความสามารถในการผลิตเอทานอลยังสามารถทดสอบจากการสร้างก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นการทดสอบความสามารถในการหมักเอทานอลในทางอ้อม เนื่องจากกระบวนการหมักเอทานอลจะมีผลิตภัณฑ์หลัก คือ เอทานอล และเกิดผลพลอยได้ คือ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เสมอ โดยกลูโคส 100 กรัม จะถูกเปลี่ยนเป็นเอทานอล

51.1 กรัม และคาร์บอนไดออกไซด์ 48.9 กรัม โดยน้ำหนัก ดังนั้นถ้ายีสต์สายพันธุ์ใดมีปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์สูงจึงคาดว่าจะมีแนวโน้มในการผลิตเอทานอลสูงด้วย

3. ความสามารถในการทนต่ออุณหภูมิสูง

ทดสอบความทนต่ออุณหภูมิสูงของยีสต์ที่คัดเลือกได้จากข้อ 2 จำนวน 23 ไอโซเลต ในอาหาร YPD และ YPX agar plate โดยแปรผันอุณหภูมิในการบ่ม คือ 37, 40, 45, 47 และ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองดังตารางที่ 2

ผลการทดลองจากตารางที่ 2 พบว่า ที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส ไม่มียีสต์สายพันธุ์ใดที่สามารถเจริญได้ โดยอุณหภูมิสูงสุดที่ยีสต์สามารถเจริญได้ในงานวิจัยครั้งนี้ คือ 47 องศาเซลเซียส มีจำนวน 13 ไอโซเลต ได้แก่ ยีสต์รหัส BRMU02, BRMU03, BRMU04, BRMU06, BRMU17, BRMU19, BRMU35, BRMU36, BRMU41, BRMU42, BRMU51, BRMU55 และ BRMU91 ในอาหาร YPD agar plate และ มียีสต์เพียงรหัสเดียวที่สามารถเจริญได้ในอาหารทั้ง YPD และ YPX agar คือ ยีสต์รหัส BRMU91 นอกจากนี้พบว่า ที่อุณหภูมิ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ยีสต์ทั้ง 23 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ดีในอาหารทั้ง 2 ชนิด

จากรายงานยีสต์ส่วนใหญ่ในห้องปฏิบัติการ และระดับอุตสาหกรรมเจริญได้ดี เมื่ออุณหภูมิอยู่ในช่วง 20 – 30 องศาเซลเซียส แต่มียีสต์บางสายพันธุ์ที่มีอุณหภูมิสูงสุดสำหรับการเจริญในช่วง 35 – 43 องศาเซลเซียส (Walker, 1998) โดยอุณหภูมิมีผลต่อสัณฐานวิทยา และความอยู่รอดของเซลล์ เนื่องจากอุณหภูมิสูงมีผลทำให้การแตกหน่อของยีสต์ผิดปกติ ผนังเซลล์เจริญไม่สมบูรณ์ การเพิ่มขนาดเซลล์

ตารางที่ 2 ความสามารถของยีสต์ที่คัดเลือกในการทนต่ออุณหภูมิสูง

รหัสยีสต์	อุณหภูมิ (°C)									
	37		40		45		47		50	
	YPD	YPX	YPD	YPX	YPD	YPX	YPD	YPX	YPD	YPX
BRMU 02	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
BRMU 03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
BRMU 04	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
BRMU 06	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
BRMU 08	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
BRMU 12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
BRMU 17	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
BRMU 19	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
รหัสยีสต์	**อุณหภูมิ (°C)**									
	37		40		45		47		50	
	YPD	YPX	YPD	YPX	YPD	YPD	YPX	YPD	YPX	YPD
BRMU 29	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
BRMU 30	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
BRMU 34	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	-	-	-
BRMU 35	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-

BRMU 36	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
BRMU 41	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
BRMU 42	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-	-
BRMU 45	+++	+++	+++	++	+++	+++	-	-	-	-
BRMU 49	+++	+++	+++	++	+++	+++	-	-	-	-
BRMU 50	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	+	-	-
BRMU 51	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
BRMU 55	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-	-
BRMU 56	+++	+++	+++	++	+++	+++	+	-	-	-

ตารางที่ 2 ความสามารถของยีสต์ที่คัดเลือกในการทนต่ออุณหภูมิสูง (ต่อ)

รหัสยีสต์	**อุณหภูมิ (°C)**									
	37		**40**		**45**		**47**		**50**	
	YPD	YPX	YPD	YPX	YPD	YPD	YPX	YPD	YPX	YPD
BRMU 61	+++	+++	+++	++	+++	+++	-	-	-	-
BRMU 91	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	-	-

<u>หมายเหตุ</u> +++ = เจริญได้ดี (เจริญเต็มแนวเขี่ยเชื้อ) ++ = เจริญปานกลาง (เจริญเกือบเต็มแนวเขี่ยเชื้อ)
+ = เจริญได้น้อย (เจริญบางส่วนของแนวเขี่ยเชื้อ) - = ไม่มีการเจริญ

ผิดปกติ มีปริมาณของเหลวในเซลล์เพิ่มขึ้น ความสามารถในการเลือกผ่านของสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง ทำลายพันธะไฮโดรเจนทำให้โปรตีน และกรดนิวคลีอิกเสื่อมสภาพ ส่งผลให้กิจกรรมการขนส่งน้ำตาลเข้าเซลล์ยีสต์ลดลง ยับยั้งกระบวนการหายใจ และการหมัก แต่เป็นข้อดีสำหรับการหมักเอทานอล โดยพบว่า เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นจาก 25 เป็น 38 องศาเซลเซียส เอนไซม์จะถูกยับยั้งทำให้เกิดการสะสมกรดไพรูเวต และเอทานอล โดยเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์แอลกอฮอล์ดีไฮโดรจีเนส (alcohol dehydrogenare) เกิดได้ดีที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Limtong, 1997) ยีสต์สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และเจริญได้มากกว่าถ้ายีสต์สายพันธุ์นั้นเป็นยีสต์ทนร้อน หรือยีสต์ที่ทนต่ออุณหภูมิสูง โดยยีสต์ที่เจริญได้ที่อุณหภูมิสูงกว่า 40 องศาเซลเซียส แต่ละสายพันธุ์จะมีการผลิตเอทานอลในปริมาณที่ต่างกัน ยกตัวอย่างเช่น *Candida tropicalis* NCYC 405, *Shizosacchamyces pombe* YSC3 หรือ *Hansenula polymorpha* ATCC 4516 สามารถผลิตเอทานอลได้ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส (Chaitep *et al*., 2012) ยีสต์ทนร้อนจะมีอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตแตกต่างกันออกไป โดยทั่วไปยีสต์ทนร้อนที่ใช้ศึกษาจะเจริญได้ในอุณหภูมิ ตั้งแต่ 35 องศาเซลเซียสขึ้นไป (Edgardoa *et al*., 2008)

4. ความสามารถในการทนต่อแรงดันออสโมซีส

แปรผันความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสและไซโลส ได้แก่ 5, 10, 15, 20, 25 และ 30 % (W/V) ในอาหาร YPD และ YPX agar plate บ่มที่อุณหภูมิ 37องศาเซลเซียส เพื่อทดสอบความทนต่อแรงดันออสโมซีส แสดงผลดังตารางที่ 3

ผลการทดลองจากตารางที่ 3 พบว่า ยีสต์ทั้ง 23 ไอโซเลต สามารถเจริญได้ดีในอาหาร YPD agar ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลสูงสุดเท่ากับ 30% (W/V) และในอาหาร YPX agar ที่ความเข้มข้นของน้ำตาลเท่ากับ 20% (W/V) โดยมียีสต์ที่สามารถเจริญได้ดีทั้งหมด 9 ไอโซเลต ได้แก่ ยีสต์รหัส BRMU17, BRMU19, BRMU29, BRMU30,

BRMU34, BRMU35, BRMU42, BRMU49 และ BRMU61 นอกจากนี้พบยีสต์ที่เจริญได้ปานกลางที่ความเข้มข้นของน้ำตาลไซโลสสูงสุดเท่ากับ 25% (W/V) ได้แก่ ยีสต์รหัส BRMU29 และ BRMU 49 แสดงให้เห็นว่าน้ำตาลกลูโคสซึ่งเป็นน้ำตาลคาร์บอน 6 อะตอม เป็นแหล่งคาร์บอนที่ยีสต์ทุกสายพันธุ์สามารถใช้ในการเจริญเติบโตได้ดี แต่น้ำตาลไซโลสซึ่งเป็นน้ำตาลคาร์บอน 5 อะตอม มียีสต์เพียงบางสายพันธุ์ที่สามารถใช้เพื่อการเจริญ ได้แก่ *Pichia stipitis* (Dubey *et al*., 2012) *Pachysoles tannophilus* (Lee, 1986) *Candida jeffriesil* (Nguyen *et al*., 2006) *C. tenuis* (Kern *et al*., 1996) *Schizosaccharomyces pombe*, *Kluyveromyces* sp. (Mcmillan , 1994)

ความเข้มข้นของแหล่งคาร์บอนมีความสำคัญในการสังเคราะห์เซลล์ และการผลิตเอทานอล การใช้แหล่งคาร์บอนที่มีความเข้มข้นสูงๆ ในการหมักเอทานอลมีผลช่วยลดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ แต่การใช้แหล่งคาร์บอนความเข้มข้นสูงๆ ก็มีข้อเสียในด้านการยับยั้งการเจริญ และการหมักเอทานอลเช่นเดียวกัน การยับยั้งนี้เกิด

ตารางที่ 3 ความสามารถของยีสต์ในการเจริญในอาหารที่มีน้ำตาลความเข้มข้นสูงขึ้น

รหัสยีสต์	ความเข้มข้นของน้ำตาล (%, W/V)											
	กลูโคส						ไซโลส					
	5	10	15	20	25	30	5	10	15	20	25	30
BRMU 02	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-	-
BRMU 03	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-	-
BRMU 04	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-	-
BRMU 06	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
BRMU 08	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
BRMU 12	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
BRMU 17	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
BRMU 19	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
BRMU 29	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+
BRMU 30	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
BRMU 34	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
BRMU 35	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	+
BRMU 36	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	+	-
BRMU 41	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	++	+	-
BRMU 42	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+	-
BRMU 45	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	+	-
BRMU 49	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	-
BRMU 50	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	+	-
BRMU 51	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	++	++	++	-	-

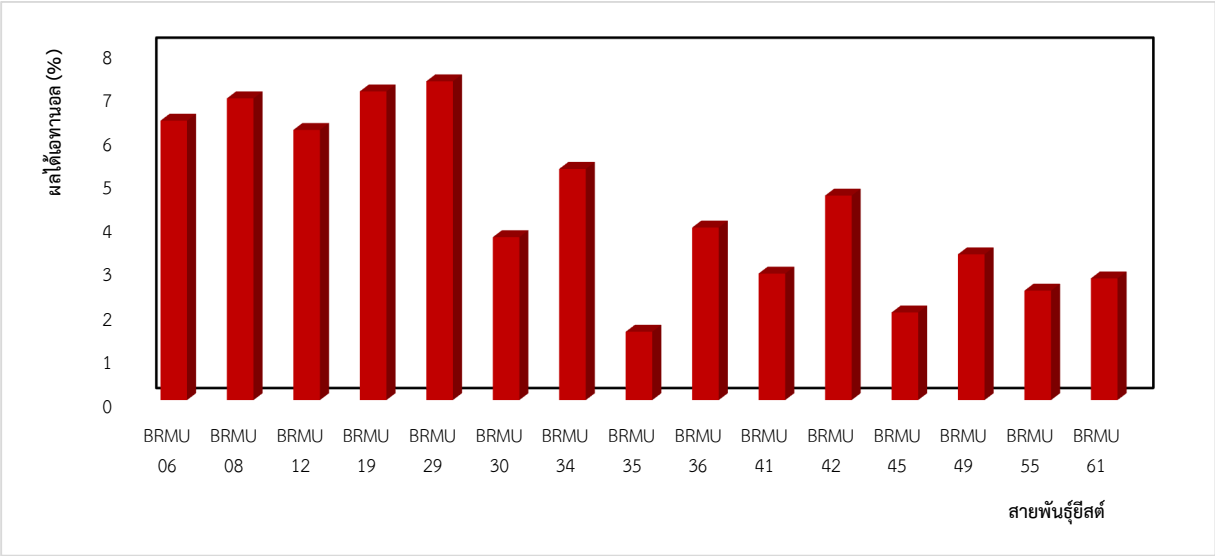
BRMU 55	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	-	-
BRMU 56	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	+++	++	+	+
BRMU 61	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++	-	-
BRMU 91	+++	+++	+++	+++	+++	++	+++	+++	++	++	+	+

หมายเหตุ +++ = เจริญได้ดี (เจริญเต็มแนวเขี่ยเชื้อ)
++ = เจริญปานกลาง (เจริญเกือบเต็มแนวเขี่ยเชื้อ)
+ = เจริญได้น้อย (เจริญบางส่วนของแนวเขี่ยเชื้อ)
- = ไม่มีการเจริญ

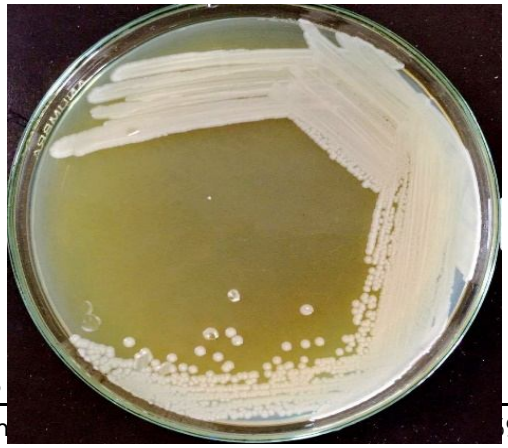
จากแรงดันออสโมซีส ทำให้เซลล์เกิดกระบวนการพลาสโมไลซีส เมื่ออยู่ในน้ำตาลที่มีความเข้มข้นสูงเท่ากับ 14% โดยน้ำหนัก และมีผลยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการไกลโคไลซีส ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการผลิตเอทานอลลดลง (Lachance, 1990 ; Panchal & Tavares, 1990; Limtong, 1997)

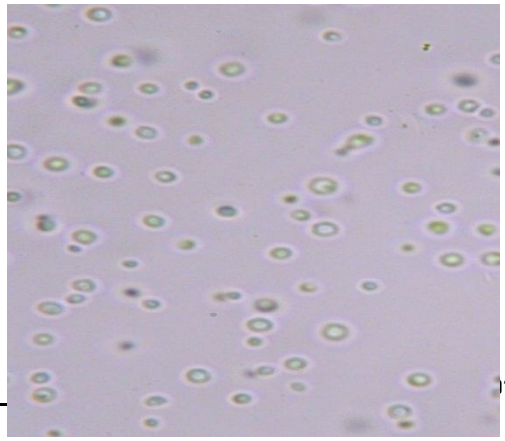
5. การเปรียบเทียบการหมักเอทานอลที่อุณหภูมิสูงในอาหารสังเคราะห์

ในการผลิตเอทานอลจากยีสต์ทนร้อนที่มีความสามารถในการหมักและทนอุณหภูมิสูงทั้ง 23 ไอโซเลต ทดสอบความสามารถโดยใช้ Fermentation medium บ่มที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาวัดปริมาณน้ำตาลรีดิวซ์ และเอทานอลที่เกิดขึ้น พบว่า ยีสต์ทนร้อนรหัส BRMU29 สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณมากที่สุดเท่ากับร้อยละ 7.28 (%, v/v) รองลงมา คือ รหัส BRMU19 เท่ากับ 7.05 และ BRMU08 เท่ากับ 6.89 (%, v/v) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 การเปรียบเทียบผลการหมักเอทานอลจากยีสต์ที่คัดเลือกสายพันธุ์ต่างๆ ในอาหารสังเคราะห์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่เวลา 48 ชั่วโมง





(ก) (ข)

ภาพที่ 1 เชื้อยีสต์รหัส BRMU29 (ก) โคโลนีที่เจริญบนอาหารแข็ง YPD บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ (ข) ลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยายภาพ 1,000 เท่า

6. ผลของอุณหภูมิสูงที่มีต่อการผลิตเอทานอล

ใช้ยีสต์จำนวน 3 ไอโซเลตที่คัดเลือกจากข้อ 5 ซึ่งให้เอทานอลสูงสุดสามลำดับแรก เพื่อหมักเอทานอลในอาหารเหลว sugarcane juice medium โดยแปรผันอุณหภูมิในการหมัก ได้แก่ 37, 40 และ 45 องศาเซลเซียส ผลการทดลองแสดงดังภาพที่ 2 จากภาพที่ 2 ที่อุณหภูมิ 37 , 40 และ 45 องศาเซลเซียส พบว่า ยีสต์ที่มีการผลิตเอทานอลได้ดีที่สุด คือ ยีสต์รหัส BRMU29 มีค่าเท่ากับ 6.67, 6.67 และ 6.61% ตามลำดับ สำหรับยีสต์รหัส BRMU08 และ BRMU19 มีการผลิตเอทานอลที่ต่ำกว่ารหัส BRMU29 โดยรหัส BRMU08 สามารถผลิตเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 , 40 และ 45 องศาเซลเซียส เท่ากับ 6.09, 5.88 และ 5.99% และเชื้อรหัส BRMU19 ให้ปริมาณเอทานอลต่ำสุด เท่ากับ 5.88, 5.49 และ 5.55% เมื่ออุณหภูมิเพิ่มขึ้นอัตราการผลิตเอทานอลจะลดลง เนื่องจากอุณหภูมิทำให้การแตกหน่อของยีสต์ผิดปกติ ผนังเซลล์เจริญไม่สมบูรณ์ การเพิ่มขนาดของเซลล์ผิดปกติ มีปริมาณของเหลวในเซลล์เพิ่มขึ้น ความสามารถในการเลือกผ่านของสารอาหารที่จำเป็นต่อเซลล์ลดลง นอกจากนี้อุณหภูมิสูงยังทำลายพันธะไฮโดรเจน ทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิคเสื่อมสภาพ ขัดขวางการสังเคราะห์โปรตีนหลายชนิด เมื่อมีการสังเคราะห์โปรตีนลดลงส่งผลให้กิจกรรมการขนส่งน้ำตาลเข้าเซลล์ยีสต์ลดลงด้วยโดยมีผลต่อการนำน้ำตาลจากน้ำอ้อยซึ่งเป็นสับสเตรทเข้าเซลล์ลดลง รวมทั้งยับยั้งกระบวนการหายใจและกระบวนการหมัก จึงทำให้ยีสต์สามารถผลิตเอทานอลได้น้อยลงที่อุณหภูมิสูงขึ้น เมื่อพิจารณาผลของน้ำตาลระยะเวลาเพิ่มขึ้นความเข้มข้นของน้ำตาลกลูโคสที่มีในระบบการหมักจะมีค่าลดลงเรื่อยๆ และเมื่อถึงชั่วโมงที่ 72 ความเข้มข้นของน้ำตาลจะลดลงเหลือร้อยละ 76.31, 71.88 และ 71.05 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร

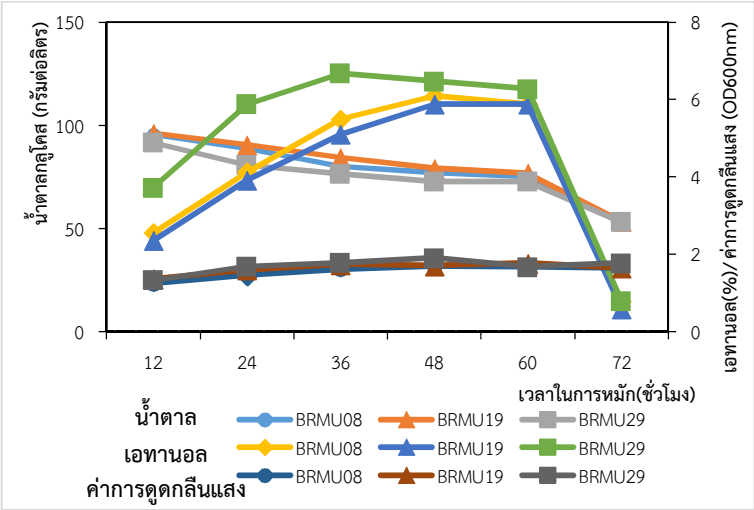
ซึ่งความเข้มข้นของน้ำตาลจะลดลงอย่างรวดเร็วในช่วง 24 ชั่วโมงแรก เนื่องมาจากในช่วงนี้เชื้อยีสต์จะมีการใช้น้ำตาลเพื่อการเจริญเติบโตและการสร้างผลิตภัณฑ์หลายชนิด เมื่อพิจารณาการเจริญของเซลล์จากค่าดูดกลืนแสงพบว่าที่ชั่วโมงที่ 24-48 การเจริญเติบโตจะเข้าสู่ระยะล็อกกาลิทึมซึ่งเป็นระยะที่เชื้อยีสต์มีการเจริญเติบโตสูงที่สุด หลังจากชั่วโมง ที่ 36 การเจริญเติบโตจะเข้าสู่ปลายระยะล็อกกาลิทึม ซึ่งการเจริญจะเข้าสู่ระยะคงที่และในช่วงนี้จะมีการสร้างสารที่เป็น secondary metabolite จำนวนมาก โดยเฉพาะเอทานอลจะสามารถผลิตได้ดีในระยะนี้

จากงานวิจัยนี้สรุปได้ว่า สามารถคัดแยกยีสต์ทนร้อนจากตัวอย่างกากชานอ้อยซึ่งเจริญได้ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้ทั้งหมด 98 ไอโซเลท ซึ่งมี 44 ไอโซเลตที่มีความสามารถในการสร้างแก๊ส การทดสอบความสามารถในการเจริญได้ที่อุณหภูมิสูง พบยีสต์ที่คัดเลือกได้ทุกไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 37-45 องศาเซลเซียส และมี 13 ไอโซเลตสามารถเจริญได้ดีที่อุณหภูมิ 47 องศาเซลเซียส และยีสต์ทนร้อนสายพันธุ์ BRMU 29 สามารถผลิตเอทานอลได้ปริมาณสูงที่สุด โดยศักยภาพของยีสต์ที่กล่าวมาข้างต้นมีความน่าสนใจในการใช้เป็นเชื้อตั้งต้นในการผลิตเอทานอลเชื้อเพลิงต่อไปในอนาคต

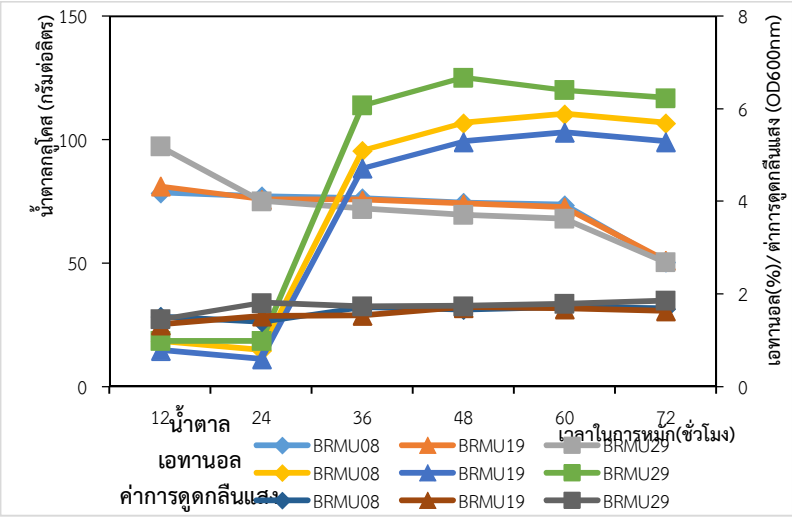
กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากสำนักงานนโยบายและแผนพลังงาน (สนพ.) กระทรวงพลังงาน ประจำปีงบประมาณ 2558 และทุนคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ประจำปีงบประมาณ 2559

(ก)



(ข)



น้ำตาลกลูโคส (กรัมต่อลิตร)

(ค)

ภาพที่ 2 (ก) การหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส (ข) การหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ (ค) การหมักเอทานอลที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส แสดงปริมาณกลูโคสในอาหารที่มีน้ำอ้อยเป็นแหล่งคาร์บอน เอทานอล และค่าดูดกลืนแสง

เอกสารอ้างอิง

Brooks, AA. 2008. Ethanol production potential of local yeast strains isolated from ripe banana peels. African Journal of Biotechnology. 7 (20): 3749-3752.

Chaitep, P., Sajai P. and Pungkongtun , R. 2012. Ethanol production from molasses using a thermotolerant yeast. Rajamangara University of Technology Lanna-Chaingmai. 72 page. (in Thai)

Dubey, A.K., Gupta, P.K., Garg N., Naithani, S. 2012. Bioethanol production from waste paper acid pretreated hydrolyzate with xylose fermenting *Pichia stipitis*. Carbohydr. Polym. 88(3): 825–829.

Edgardoa, A., Carolina, P., Manuel, R., Juanitaa, F. and Jaime, B. 2008. Selection of thermotolerant yeast strains *Saccharomyces cerevisiae* for bioethanol production. Enzyme and Microbial Technology. 43: 120-123.

Haggran, A.A. and Abo-Sereih Nivien, A. 2014. Isolation and Identification of Ethanol Tolerant Yeast Strains. Middle East Journal of Applied Sciences. 4(3): 600-606.

Kern, M., Haltrich, D., Nidetzky, B. and Kulbe , K.D. 1996. Induction of aldose reductase and xylitol dehydrogenase activities in *Candida tenuis* CBS 4435. FEMS Microbiol. Lett. 149, 31.

Lachance, Marc-Andre. 1990. Yeast selection in nature. In C.J. Panchal (ed.). Yeast Strain Selection. pp. 21- 41. New York, Marcel Dekker Inc.

Lee, H., James, A. P., Zahab, D. M., Mahmourides, G., Maleszzka, R. and Schneider, H. 1986. Mutants of *Pachysolen tannophilus* with improved production of ethanol from D-xylose. Applied and Environmental Microbiolog. 51: 1252-1258.

Limtong S. 1997. Yeast and Technology . Bangkok: Department of Microbiology, Faculty of Science. Kasetsart University. 304 page.

Limtong , S., Sringiew, C., Yongmanitchai, W. 2007. Production of fuel ethanol at high temperature from sugar cane juice by a newly isolated *Kluyveromyces marixianus*. Bioresour. Technol. 98: 3367-3374.

Limtong, S., Srisuk, N., Tuntirungkit M., Kongseree P., Yongmanitchai, W., Pisanpong , M., Kitpreechavanit, W., Chonudomkul, D., Chuantrakoon, O., Yungsaard, N., Koowajanakul, N., Tongpu, P., Aekchaweng, K., Rattanapan, A. and Aeadpum, A. 2008. Development of bioethanol production by thermotolerant yeasts. Kasetsart University. Bangkok. 364 page.

McMillan, J. D. 1994. Conversion of hemicellulose hydrolysates to ethanol. ACS Symp. Ser, 566: 411-437.

Nguyen, N. H., Suh, S. O., Marshall, C. J. and Blackwell, M. 2006. Morphological and ecological . similarities: wood- boring beetles associated with novel xylose-fermenting yeasts,*Spathaspora passalidarum*gnov. and *Candida jeffriesiisp*. nov. Mycol Res.110: 1232–1241.

Panchal, C.J. and Tavares, F.C.A. 1980. Yeast strain selection for fuel ethanol production. In C.J, Panchal (ed.), Yeast Strain Selection, pp. 225-243. New York. Marcel Dekker Inc.

Pimpakan, P. 2012. Bioethanol production at high temperature from sugarcane syrup by Thermotolerant yeast, *Kluyveromyces marxianus* DMKU-3-1042. Kasetsart University. 154 page. (in Thai)

Walker, G.M. 1998. Yeast physiology and biotechnology. John Wiley & Sons. New York.

Zabed, H., Faruq, G., Sahu, J.N., Azirun, M.S., Hashim, R. and Boyce, A.N. 2014. Bioethanol Production from fermentable sugar juice. Hindawi Publishing Corporation The Scientific World Journal. 11 pages.